

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
Washington, DC 20231

Transmitted herewith for filing is the patent application of:

Inventors: Toru IMAMURA, et al.

For: HEPARIN-BINDING PROTEINS MODIFIED WITH SUGAR CHAINS, METHOD OF PRODUCING THE SAME
AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THE SAME

Enclosed are:

☒ Submission of Application for Filing Date

☒ Letter re Priority

The filing fee has been calculated as shown below:

(Col. 1)		(Col. 2)	SMALL ENTITY		OR	LARGE ENTITY	
FOR:	NO. FILED	NO. EXTRA	RATE	FEE		RATE	FEE
BASIC FEE				\$395			\$790
TOTAL CLAIMS	- 20 =	* 13	x \$ 11	\$		x \$ 22	\$
INDEP. CLAIMS	- 3 =	* 1	x \$ 41	\$		x \$ 82	\$
[] MULTIPLE DEPENDENT CLAIM PRESENTED			+ \$135	\$		+ \$270	\$
*If the difference in Col. 1 is less than zero, enter "0" in Col. 2			TOTAL: \$			\$790.00	

Please charge my Deposit Account No. _____ in the amount of _____. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

A check in the amount of \$790.00 is **not** enclosed to cover:

☒ the filing fee

[] Other:

The Commissioner is hereby authorized to charge payment of the following fees associated with this communication or credit any overpayment to Deposit Account No. _____. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

☐ Any additional filing fees required under 37 CFR 1.16.

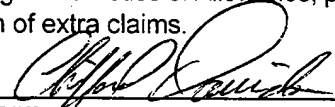
☐ Any patent application processing fees under 37 CFR 1.17.

☒ The Commissioner is hereby authorized to charge payment of the following fees during pendency of this application or credit any overpayment to Deposit Account No. _____. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

☐ Any patent application processing fees under 37 CFR 1.17.

☐ The issue fee set in 37 CFR 1.18 at or before mailing of the Notice of Allowance, pursuant to 37 CFR 1.311(b).

☐ Any filing fees under 37 CFR 1.16 for presentation of extra claims.


Clifford M. Davidson
Reg. No. 32,728
DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC
1140 Avenue of the Americas
New York, New York 10036
(212) 997-1028

"Express Mail" mailing label no. EE723741163US

Date of Deposit: July 22, 1998

I hereby certify that at this correspondence and/or fee is being deposited with the United States Postal Service "Express Mail Post Office to Addressee" service under 37 CFR 1.10 on the date indicated above, in an envelope addressed to: "Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231".

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By: 

UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Re: Application of: Toru IMAMURA et al.

Serial No.: Not Yet Known

Filed: Simultaneously Herewith

For: **HEPARIN-BINDING PROTEINS MODIFIED WITH
SUGAR CHAINS, METHOD OF PRODUCING THE
SAME AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS
CONTAINING THE SAME**

SUBMISSION OF APPLICATION FOR FILING DATE

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

July 22, 1998

Sir:

In accordance with 37 CFR 1.53 there is submitted herewith for filing in connection with the above application, and in accordance with 37 CFR 1.53 (b), for assignment of a serial number and filing date, the following:

1. A specification in the Japanese language. A verified English translation is **not** enclosed. However, a verified English translation will be submitted under 37 CFR 1.52(d).
2. The appropriate filing fee, i.e. \$790.00, is **not** enclosed, but will be submitted at a later date..
3. This application is **not** accompanied by a signed Declaration or Oath and Power of Attorney. However, a Declaration will be submitted.

"Express Mail" mailing label no. EE723741163US

Date of Deposit: July 22, 1998

I hereby certify that this correspondence and/or fee

is being deposited with the United States Postal Service

"Express Mail Post Office to Addressee" service under 37

CFR 1.10 on the date indicated above, in an envelope

addressed to: "Assistant Commissioner for Patents,

Washington, DC 20231".

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, P.A.C

By: 

The Declaration will set forth the names, addresses, residence and citizenship of all of the inventors, as follows:

Toru IMAMURA
2-20-12-1301, Senju-Azuma, Adachi-ku
Tokyo 120-0025 Japan
Citizenship: Japan

Masahiro ASADA
7-604 Ninomiya Danchi, 4-8-3, Ninomiya,
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0051 Japan
Citizenship: Japan

Syuichi OKA
1133-2, Nagakuni Higashimachi, Tsuchiura-shi,
Ibaraki 300-0817 Japan
Citizenship: Japan

Masashi SUZUKI
4-110-301, Azuma, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0031
Japan
Citizenship: Japan

Atsuko YONEDA
B201 Vila Inarimae, 24-18, Inarimae, Tsukuba-shi,
Ibaraki 305-0061 Japan
Citizenship: Japan

Keiko OTA
M2-3 Shihoh Residence, 2-18-33, Umezono
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0045 Japan
Citizenship: Japan

Yuko ODA
203 Taiyo Residence, 1-12-17, Ninomiya,
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0051 Japan
Citizenship: Japan

Kazuko MIYAKAWA
202 Numajiri Apartment, 17-21, Inarimae,
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0061 Japan
Citizenship: Japan

Noriko ORIKASA
205 Ohyama Heights, 22-10, Higashiarai,
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-033 Japan
Citizenship: Japan

Chie ASADA
7-604 Ninomiya Danchi, 4-8-3, Ninomiya,
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0051 Japan
Citizenship: Japan


Tetsuhito KOJIMA
5-16, Oritochou, Showa-ku, Nagoya-shi,
Aichi 466-0858 Japan
Citizenship: Japan

The Declaration will appoint the undersigned as attorney. Please note the correspondence address: Davidson, Davidson & Kappel, LLC, 1140 Avenue of the Americas, 15th Floor, New York N.Y. 10036 (212) 997-1028.

According to the provisions of 37 CFR 1.53, a filing date should now be accorded this application, which date is the date that the above application parts are received in the Patent and Trademark Office.

Respectfully submitted,

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC

By: 
Clifford M. Davidson
Reg. No. 32,728

DAVIDSON, DAVIDSON & KAPPEL, LLC
1140 Avenue of the Americas, 5th Floor
New York, New York 10036
(212) 997-1028

糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを含有する医薬組成物

明細書

発明の背景

本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを含有する医薬組成物に関する。

従来、ヘパリン結合性タンパク質、なかでも繊維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor、以下、「FGF」と記す。）ファミリーに分類されるタンパク質及びその類似体（fibroblast growth factor homologous factors）は、硫酸化多糖であるヘパリンとヘパラン硫酸に非共有的な結合様式で強く結合することが知られていた。そして繊維芽細胞増殖因子などのヘパリン結合性タンパク質をヘパリンなど硫酸化多糖との混合物とした場合、ヘパリン結合性タンパク質の生物活性や物性が変化し、その機能が変化し、高機能化する場合のあることが知られていた。しかしながら、硫酸化多糖を混合しても、期待できる高機能化は限定的なものであった。また、これらを医薬組成物として用いる場合には、遊離状態の硫酸化多糖による好ましくない生理活性が問題となっていた。ヘパリン結合性タンパク質の高機能化を意図してヘパリン結合性タンパク質と硫酸化多糖を共有結合によって一体化したタンパク質はこれまで存在しなかった。

また、従来、ヘパリン結合性タンパク質、なかでもFGFファミリーに分類されるタンパク質及びその類似体の機能に対し、アスパラギン結合型糖鎖（以下、「N-型糖鎖」という。）またはセリン・スレオニン結合型糖鎖（以下、「O-型糖鎖」という。）の人工的な共有結合的一体化によってヘパリン結合性タンパク質の機能が高機能化出来ることは一切知られていなかった。さらにN-型糖鎖またはO-型糖鎖が与える一般的な影響については知られていなかった。例外として、FGF-6 について、本来それが有するN-型糖鎖の役割が生体外翻訳の系で示唆されたが、直接証明されてはいなかった。これまでに、ヘパリン結合性タンパク質の高機能化を意図してヘパリン結合性タンパク質とN-型糖鎖またはO-型糖鎖を共有結

合によって一体化した例は存在しなかった。

本発明の目的は、ヘパリン結合性タンパク質の機能改質をめざし、糖鎖を共有結合させたヘパリン結合性タンパク質とその製造方法を確立し、これを含む医薬組成物を提供することにある。

発明の概要

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖及びO-型糖鎖の各々が動物生体中では糖タンパク質の糖鎖として合成されることに着目し、これらの糖鎖のいずれかの付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質のcDNAを連結し、この連結cDNAの遺伝子産物を動物細胞に生産させることにより、共有結合によって結合している硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖又はO-型糖鎖を分子内に有するヘパリン結合性タンパク質を製造できることを見出し、さらに、これらの糖鎖が付加したヘパリン結合性タンパク質の機能が向上していることを確認した。本発明はこのような知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質を提供する。糖鎖は、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されてもよい。ヘパリン結合性タンパク質はFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子であってもよい。ヘパリン結合性タンパク質は、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖を共有結合していてもよい。例えば、糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質は、以下の(a)または(b)のいずれかのタンパク質であってもよい。

(a) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、FGF活性を有し、かつ糖鎖の付加

を受けることができるタンパク質。

本発明のヘパリン結合性タンパク質においては、ヘパリン結合性タンパク質の2次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍に糖鎖が結合しているか、あるいは、糖鎖付加によって3次元構造が大きく変化しない部位に糖鎖が結合しているとよい。

また、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、以下の工程：

(a) 糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質をコードするcDNAとを連結する工程、

(b) 当該連結cDNAを発現ベクターに組み込む工程、

(c) 当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入する工程、および

(d) 当該宿主細胞において、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質を発現させる工程を含むことを特徴とする前記の方法を提供する。糖鎖が硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンである場合には、糖鎖の付加を受けることができるペプチドはプロテオグリカンコアタンパク質またはその一部分であるとよい。糖鎖がN-型糖鎖である場合には、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがN-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドであるとよい。糖鎖がO-型糖鎖である場合には、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがO-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドであるとよい。また、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、糖鎖を化学的結合法によりヘパリン結合性タンパク質に結合させる工程を含む前記の方法を提供する。糖鎖は、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択されてもよく、ヘパリン結合性タンパク質はFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子であってもよい。さらに、本発明は、糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。さらにまた、本発明は、糖鎖を持たない天然のタンパク質に糖鎖を共有結合させることにより、タンパク質を

高機能化する方法も提供する。

本発明の新規な糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性、蛋白質分解酵素抵抗性などの安定性に優れている。従って、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を医薬品に利用することにより、生体内での安定性、特に、耐酸性、耐アルカリ性といった安定性に優れ、経口投与への適用が可能な医薬品を設計することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、代表的な硫酸化多糖およびグリコサミノグリカン糖鎖の例を示す。

図 2 は、代表的なN-型糖鎖の例を示す。

図 3 は、代表的なO-型糖鎖の例を示す。

図 4 は、各種FGF-1a類似タンパク質のSDS変性電気泳動図を示す。

図 5 は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aのHUVEC に対するDNA合成促進活性を示す。

図 6 は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aの耐熱安定性、耐酸安定性および耐アルカリ安定性を示す。

図 7 は、S/FGF-1a-II および大腸菌由来FGF-1aのトリプシンに対する抵抗性を示す。

図 8 は、N-FGF-6/1a-IVおよび大腸菌由来FGF-1aのHUVEC に対するDNA 合成促進活性を示す。

図 9 は、S/FGF-1a-II のヘパリン親和性を示す。

好ましい態様の説明

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、糖鎖を共有結合させるべきヘパリン結合性タンパク質は、ヘパリン結合性を有するタンパク質であり、具体例としては、FGFファミリーに属する因子または近縁の因子、またはヘパリン結合性を有するが前者と構造的な類

似性はない他のタンパク質を挙げることができる。ここで述べる他のタンパク質としては、具体的には、ヘパリン結合性上皮細胞増殖因子様因子（HB-EGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）などが挙げられるが、これに限定されるものではない。FGFファミリーに属する因子または近縁の因子の具体例としては、FGF-1～10や、FHF(fibroblast growth factor homologous factor)-1～4などが知られている。ヘパリン結合性タンパク質は、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖を共有結合していてもよい。例えば、糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質は、以下の（a）または（b）のいずれかのタンパク質であってもよい。

（a）配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質。

（b）配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、FGF活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質。

配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27および29のアミノ酸配列を有するタンパク質は、例えば、配列番号2、4、6、18、20、22、24、26、28および30のDNA配列によりそれぞれコードされる。これらのタンパク質は、FGFファミリーに属する因子のペプチド配列の他、糖鎖の付加を受けることができるペプチド配列とシグナルペプチドの配列を含んでいる。本明細書でいうヘパリン結合性タンパク質は、配列表に記載されたcDNAが一次的に規定するタンパク質に加えて、細胞から分泌される際にそのアミノ末端に存するシグナルペプチドと呼ばれる分泌の為のペプチド配列が切断された形のタンパク質を含む。本発明の医薬組成物の有効成分として含有させるヘパリン結合性タンパク質は、初めからシグナルペプチドを欠損する形で製造してもその有用性には変化がない。

ヘパリン結合性タンパク質に共有結合させる糖鎖は、共有結合させることによりヘパリン結合性タンパク質が高機能化されるものであれば、いかなるものであってもよく、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖、グリコサミ

ノグリカン、N-型糖鎖、およびO-型糖鎖を例示することができるが、これらに限定されることはない。本明細書において、「高機能化」とは、対象のタンパク質の活性が上がることを意味する。高機能化の例として、糖鎖をタンパク質に共有結合させることにより、熱、酸またはアルカリによる処理の後に残っている活性が、糖鎖を共有結合させていないタンパク質に比べて、高くなることが挙げられる。本明細書でいう硫酸化多糖とは、タンパク質の一次構造に存するセリン残基に結合したキシロースを起点として伸長する、もしくは後述のN-型糖鎖やO-型糖鎖の非還元末端側に伸長する、あるいは遊離状態で存在する多様な糖鎖構造を総称するものであり、その多くはアミノ糖とウロン酸（またはガラクトース）の二糖単位の繰り返し構造をもち、いくつかの水酸基あるいはアミノ基が硫酸基で置換されているものをいう。また、グリコサミノグリカンとは、同様の構造を有するものであるが、硫酸基での置換がないものも含む。本明細書では、これらを総称して、硫酸化多糖等と記す。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」（永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック）などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図1に示す。本明細書でいうN-型糖鎖とは、タンパク質の一次構造に存するアスパラギン残基に結合したN-アセチルグルコサミンを起点として伸長する多様な糖鎖構造を総称するものである。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」（永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック）などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図2に示す。本明細書でいうO-型糖鎖とは、タンパク質の一次構造に存するセリン残基またはスレオニン残基に結合したN-アセチルガラクトサミンを起点として伸長する多様な糖鎖構造を総称するものである。具体的な構造は、「糖鎖の細胞における運命」（永井・箱守・木幡編、講談社サイエンティフィック）などに記載されており、代表的な糖鎖配列を図3に示す。これらの硫酸化多糖等、N-型糖鎖およびO-型糖鎖は、その機能を発揮する限りにおいて、その糖鎖配列の一部に、付加、欠失、置換または修飾があってもよい。

糖鎖をヘパリン結合性タンパク質に結合させるにあたっては、糖鎖のみを直接ヘパリン結合性タンパク質に共有結合させてもよいし、糖鎖を共有結合している任意の長さのペプチド鎖をヘパリン結合性タンパク質に共有結合させてもよい。

本発明の糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質（以下、「糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質」と記す。）を製造するには、まず、糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質をコードするcDNAとを連結し、これを適切な発現ベクターに組み込み、当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入して、糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。

各種ヘパリン結合性タンパク質のcDNAは、DDBJ（日本DNAデータバンク）など遺伝子バンクに登録された配列から適当なプライマーを設計し、当該動物の当該組織のmRNAよりRT-PCR（逆転写PCR）を行うことによって、取得できる。

硫酸化多糖等付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAを硫酸化多糖等の付加を受けることが知られているペプチドをコードするcDNAと連結し、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込み、当該ベクターを宿主細胞に導入して、硫酸化多糖等付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。硫酸化多糖等の付加を受けることが知られているペプチドとしては、各種プロテオグリカン（例えば、シンデカン、グリピカン、パールカンなど）のコアタンパク質またはその一部分が挙げられる。プロテオグリカンのコアタンパク質の一部としては、プロテオグリカンの糖鎖付加部位と考えられるSer-Glyの繰り返し配列を含むペプチドが挙げられる。

N-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAをN-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドをコードするcDNAとライゲートし、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込む。さらに当該ベクターを宿主細胞に導入し、N-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を発現させればよい。N-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドの例として、Asn-X-Thr、Asn-X-Ser（配列中、X はプロリン以外の任意のアミノ酸である。）が挙げられる。

O-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を製造するには、まず、ヘパリン結合性タンパク質のcDNAをO-型糖鎖の付加を受けることが既知であるペプチドをコードするcDNAとライゲートし、これを適切な宿主細胞発現ベクターに組み込む。さらに当該ベクターを宿主細胞に導入し、O-型糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパ

ク質を発現させる。O-型糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドの例として、Ala-Thr-Pro-Ala-Proが挙げられる。

本発明で糖鎖を結合させる部位としては、ヘパリン結合性タンパク質の2次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍や糖鎖付加によって3次元構造が大きく変化しない部位がよい。

本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の製造方法の一例を以下に説明する。

まず、分泌シグナルおよび糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドをコードするオリゴヌクレオチドを合成し、あるいはPCR反応によって増幅し、これをヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドの5'端に組み込む。

分泌シグナルおよび糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドとしては、例えば、典型的な分泌型糖タンパク質のアミノ末端を利用することができ、具体的には、マウスFGF-6のN末端より40残基のアミノ酸などが挙げられる。

ヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドは、ヘパリン結合性タンパク質をコードするDNAを適当なプラスミドに組み込むことにより調製することができる。このヘパリン結合性タンパク質をコードするDNAを組み込むプラスミドとしては、宿主内で複製保持されるものであれば、いずれも使用することができるが、例えば大腸菌由来のpBR322、pUC18、及びこれらを基に構築されたpET-3cなどを挙げるができる。

ヘパリン結合性タンパク質をコードするプラスミドに上記のオリゴヌクレオチドを組み込む方法としては、例えばT. Maniatisら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 239 (1982)に記載の方法などが挙げられる。

上記のようにして作製したプラスミドから、分泌シグナル、糖鎖の付加を受けることが知られているペプチドおよびヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域（以下、「糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域」と記す。）を切り出し、これを発現に適したベクター中のプロモーターの下流に連結することにより、発現型ベクターを得ることができる。

上記の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を含む領域はその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終始コ

ドンとしてのTAA、TGA またはTAG を有してもよい。さらに該コーディング領域にコードされているタンパク質を発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する宿主が枯草菌である場合には、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合には、PH05プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーターなどが挙げられる。また、宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーターが挙げられる。

このようにして構築された糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする塩基配列を有する組み換えDNAを組み込むプラスミドとしては、宿主細胞内で発現されるものであれば、いずれも使用することができるが、例えば大腸菌由来のpBR322、pUC18などを基に構築されたベクターなどを挙げるができる。

プラスミドに組み込む方法としては、例えばT.Maniatisら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 239 (1982)に記載の方法などが挙げられる。

上記の組み換えDNAを含むベクターを宿主細胞に導入することにより、該ベクターを保持する形質転換体を製造する。

宿主細胞としては、糖鎖付加経路を有するものであれば、いかなるものであってもよく、枯草菌（例えばBacillus subtilis DB105）、酵母（例えばPichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae）、動物細胞（例えばCOS cell, CHO cell, BHK cell, NIH3T3 cell, BALB/c3T3 cell, HUVE cell, LE11 cell）、昆虫細胞（例えば、Sf-9 cell、Tn cell）などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

上記の形質転換は、それぞれの宿主について一般的に行われている方法で行う。また、一般的でなくとも適用可能な方法ならばよい。例としては、宿主が酵母であればリチウム法その他の方法により作成したコンピタント細胞に組み換えDNAを含むベクターを温度ショック法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。宿主が動物細胞であれば、増殖期等の細胞に組み換えDNAを含むベ

クターをリン酸カルシウム法、リポフェクション法あるいはエレクトロポレーション法により導入する。

このようにして得られた形質転換体を培地にて培養することにより、糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を産生させる。形質転換体を培養する場合、培養に使用される培地としては、それぞれの宿主について一般的に用いられているものを用いる。または一般的でなくとも適用可能な培地ならば良い。例としては、宿主が酵母であればYPD培地などを用いる。宿主が動物細胞であれば、Dulbecco's MEMに動物血清を加えたものなどを用いる。培養は、それぞれの宿主について一般的に用いられている条件で行う。また一般的でなくとも適用可能な条件ならばよい。例としては、宿主が酵母であれば約25～37℃で、約12時間～2週間行い、必要により通気や攪拌を加えることができる。宿主が動物細胞であれば約32～37℃で、5% CO₂、100%湿度の条件で約24時間～2週間行い、必要により気相の条件を変えたり攪拌を加えることができる。

上記のような形質転換体の培養物から糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を得るには、培養液中に放出されたものを、遠心分離後の上澄み液から直接回収できる。また、培養菌体あるいは細胞から抽出する場合には、培養後、ホモジェナイザー、フレンチプレス、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解によって菌体あるいは細胞を破壊することにより菌体外に目的のタンパク質を溶出させ、可溶性の画分から該タンパク質を得ることができる。また目的のタンパク質が不溶性画分に含まれる場合は菌体あるいは細胞を破壊後、遠心分離により不溶性画分を回収し、塩酸グアニジンなどを含む緩衝液などによって可溶性にして回収する方法も用いる。このほか塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤を含む緩衝液によって直接菌体あるいは細胞を破壊し、菌体外に目的のタンパク質を溶出させる方法もある。

上記上澄み液から糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を精製するには、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析、溶媒沈殿、透析、限外濾過、ゲル濾過、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、等電点電気泳動などが使

用されうる。さらに、多くのヘパリン結合性タンパク質については、ヘパリンセファロースを担体としたアフィニティークロマトグラフィー法が適用できる。

このようにして得られた標品は糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の活性が損なわれない限りにおいて透析、凍結乾燥を行い、乾燥粉末とすることもできる。さらに、担体として血清アルブミンなどを添加して保存することは、標品の容器への吸着を防ぐのに有効である。

また、精製過程、あるいは保存過程での微量の還元剤の共存は、該標品の酸化を防ぐのに好適である。還元剤としては、 β -メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、グルタチンなどが挙げられる。

本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、化学的な方法で糖鎖をヘパリン結合性タンパク質に結合させることにより、製造することもできる。その具体的な方法としては以下のa), b)いずれか、あるいはこれらの組み合わせによる方法が考えられる。

a) 例えば、まず、これらの糖鎖を生物学的方法または化学的合成法またはこれの適宜組み合わせた方法により完成させる。その際、糖鎖末端に適当なタンパク質結合用の残基を導入しておくこともできる。例えば、完成された糖鎖の還元末端を還元および部分酸化することによりアルデヒド基を形成し、これをタンパク質中のアミノ基とアミノ結合させることにより、糖鎖とタンパク質の結合が完成する。

b) 例えば、まず、単糖の還元末端、あるいは単糖に結合した適当なタンパク質結合用の残基を還元および部分酸化することによりアルデヒド基を形成し、これをタンパク質中のアミノ基とアミノ結合させることにより、単糖とタンパク質の結合が完成する。この単糖の水酸基などの官能基にさらなる単糖や糖鎖などを結合させることにより、糖鎖を完成させる。この結合には生物学的方法または化学的合成法またはこれの適宜組み合わせた方法などが考えられる。

ヘパリン結合性タンパク質に糖鎖を共有結合させることにより高機能化したタンパク質は医薬として利用可能である。例えば、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、FGFの生理的機能を調節する作用を有する。FGFの生理的機能とは、具体的には、繊維芽細胞、血管内皮細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞

胞、グリア細胞の増殖を促進または抑制することという。従って、本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、細胞増殖や肝臓など組織再生の促進、創傷治癒や神経機能調節、および繊維芽細胞等の増殖調節に有効であり、各種疾病、具体的には、繊維芽細胞腫、血管腫、骨芽腫、神経細胞死、アルツハイマー病、パーキンソン病、神経芽腫、健忘症、痴呆病、心筋梗塞の予防や治療に有用であり、発毛剤、育毛剤などとしても利用可能である。

上記のようにして得られた糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質は、医薬的に許容できる溶剤、賦形剤、担体、補助剤などを使用し、製剤製造の常法に従って液剤、ローション剤、エアゾール剤、注射剤、散剤、顆粒剤、錠剤、坐剤、腸溶剤およびカプセル剤などの医薬組成物としてもよい。

医薬組成物中、有効成分である糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質の含有量は、0.0000000001～1.0重量％程度とすればよい。

該医薬組成物は、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ等の哺乳動物に対して非経口的にまたは経口的に安全に投与することができる。本医薬組成物の投与量は、剤形、投与ルート、症状等により適宜変更しうるが、例えばヒトを含む哺乳動物に投与する場合、当該糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質を、0.0001～100mgを患部に1日に数回適用することが例示される。

以上、ヘパリン結合性タンパク質を例にとり本発明を説明したが、糖鎖を共有結合させることにより、ヘパリン結合性タンパク質以外の糖鎖を持たない天然のタンパク質も高機能化させることができる。

微生物の寄託

本発明の糖鎖付加型ヘパリン結合性タンパク質をコードする遺伝子（配列番号2、4、18、20、22、24、26、28および30のDNA配列をそれぞれ有する）を組み込んだプラスミドを含む大腸菌DH5 α 株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM BP-6428、FERM BP-6424、FERM BP-6427、FERM BP-6431、FERM BP-6429、FERM BP-6430、FERM BP-6423、FERM BP-1625 およびFERM BP-6426にて、平成9年9月10日に寄託されている。

以下、実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

〔実施例 1〕

1) S/FGF-1a-II プラスミドの構築

1. ヒトリュウドカン cDNA 断片の作成

phR7A8は、ヒトリュウドカンの cDNA (PCR産物) を pBluescript II (KS+) クローニングベクターの EcoR V 部位に挿入したプラスミドである。アセッション番号 D13292 に示される mRNA 配列のうち、7 番目から 2610 番目までを含む (B. B. R. C. Vol. 190, No. 3, p. 814-822, 1993 を参照のこと)。

これを Pvu II で消化し、得られた 2,232塩基対の DNA断片を鋳型として PCR (Polymerase Chain Reaction:ポリメレース連鎖反応) を行った。プライマーとして # 109 (5'-TTG TCG ACC CAC CAT GGC CCC CGC CCG TCT-3') (配列番号 7) および、# 111 (5'-TTG ATA TCT AGA GGC ACC AAG GGA TG-3') (配列番号 8) を用いた。特異的に増幅された 276塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal I で二重切断した。得られた、268 塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

2. FGF-1a/pBluescript II (KS+)

ヒト FGF-1 cDNA を鋳型とし、# 967 (5'-GCG TCG ACA GCG CTA ATT ACA AGA AGC CCA AAC TC-3') (配列番号 9) および # 630 (5'-CCG AAT TCG AAT TCT TTA ATC AGA AGA GAC TGG-3') (配列番号 10) をプライマーとして PCR反応を行った。特異的に増幅された 434塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR I および Sal I で二重切断した。得られた、422 塩基対のバンドを分離抽出し、これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pBluescript II (KS+) クローニングベクター (2934 塩基対) に挿入して、FGF-1a/pBluescript II (KS+) を得た。

FGF-1a/pBluescript II (KS+) を Aor51H I および Sal I で順次消化し、得られた2626塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

3. S/FGF-1a-II キメラ遺伝子の作成

ヒトリュウドカンの PCR産物の EcoR V/Sal I 断片、及び FGF-1a/pBluescript II (KS+)の Aor51H I/Sal I 断片を DNA連結反応に供し、S/FGF-1a-II/pBluescript II (KS+)ベクターを得た。さらにこれを、EcoR Iおよび Sal I で二重切断し、得られた、678 塩基対のバンドを分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、S/FGF-1a-II/pMEXneo を得た。この発現型ベクターは、配列番号 2 の塩基配列を含む。

2) S/FGF-1a-II の発現

得られた S/FGF-1a-II/pMEXneoをリポフェクション法によって CHO-K1 細胞 (チャイニーズハムスター卵巣細胞 K1 亜株) に遺伝子導入し、ジェネティシン存在下で培養することによって遺伝子導入細胞を選択した。得られた細胞を培養皿ほぼいっぱいになるまで増やし、培地を無血清培地に交換することによって物質生産量を増大させた。2 日毎に培地を交換し、得られた馴化培地は低速遠心分離した後、その上清を 4℃で保存した。

3) N-FGF-6/1a-IV プラスミドの構築

1. マウス FGF-6 cDNA 断片の作成

マウス FGF-6 cDNA を鋳型とし、# 1048 (5'-GCG TCG ACC CAC CAT GTC CCG GG AGC AGG ACG TGT TCA GGG CAC GCT GCA GGC TCT CGT CTT C-3') (配列番号 1) および # 968 (5'-GCG ATA TCC AGT AGC GTG CCG TTG GCG CG-3') (配列番号 1 2) をプライマーとして PCR反応を行った。特異的に増幅された 138塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR Vおよび Sal I で二重切断した。得られた、130 塩基対のバンドを分離抽出し、以下に示す連結反応に用いた。

2. N-FGF-6/1a-IVキメラ遺伝子の作成

マウス FGF-6の PCR産物の EcoR V/Sal I 断片、及び FGF-1a/pBluescript II (KS+)の Aor51H I/Sal I 断片を DNA連結反応に供し、N-FGF-6/1a-IV/pBluescr

ipt II (KS+)ベクターを得た。さらにこれを、EcoR Iおよび Sal Iで二重切断し、得られた、540 塩基対のバンドを分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、N-FGF-6/1a-IV/pMEXneo を得た。この発現型ベクターは、配列番号 4 の塩基配列を含む。

4) N-FGF-6/1a-IV の発現

上述、S-FGF-6/1a-IIと同様に N-FGF-6/1a-IV/pMEXneoを CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、N-FGF-6/1a-IV を培養上清中に分泌させた。

5) O-FGF-6/1aプラスミドの構築

1. N-FGF-6/1a<NQ> キメラ遺伝子の作成

N-FGF-6/1a/pBluescript II (KS+) ベクターを鋳型とし、# 105 (5'-GCG TCG ACC CAC CAT GTC-3') (配列番号 1 3) および # 124 (5'-GCG ATA TCC AGT AGC GTG CCT TGG GCG CG-3') (配列番号 1 4) をプライマーとして PCR反応を行った。特異的に増幅された 138塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出後、EcoR V および Sal Iで二重切断した。得られた、130 塩基対のバンドを、FGF-1a/pBluescript II (KS+) の Aor51H I/Sal I断片と共に DNA連結反応に供し、N-FGF-6/1a<NQ>/pBluescript II (KS+) ベクターを得た。

2. O-FGF-6/1a キメラ遺伝子の作成

N-FGF-6/1a<NQ>/pBluescript II (KS+) を鋳型とし、# 098 (5'-GCT GGA GGA GGC TGC TAC TCC AGC TCC AAA CCA TTA CA-3') (配列番号 1 5) および、# 116 (5'-GCC GCT CTA GAA CTA GTG GAT-3') (配列番号 1 6) をプライマーとして一次 PCR反応を行い、特異的に増幅された 210塩基対のバンドを精製し、この PCR産物と # 115 (5'-AAC AAA AGC TGG GTA CCG GG-3')をプライマーとして二次 PCR反応を行った。特異的に増幅された 631塩基対のバンドを電気泳動により分離し、これを抽出、精製後、EcoR I および Sal Iで二重切断した。得られた、558 塩基対のバンドを、分離抽出した。これを、EcoR I, Sal I で二重切断した pMEXneo発現ベクター (5916塩基対) に挿入して、O-FGF-6/1a/pMEXneoを得た。こ

の発現型ベクターは、配列番号 6 の塩基配列を含む。

6) O-FGF-6/1aの発現

上述のS/FGF-1a-II と同様に O-FGF-6/1a/pMEXneo を CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、O-FGF-6/1aを培養上清中に分泌させた。

7) 大腸菌でのFGF-1aの発現

上述のとおり得られたヒトFGF-1a cDNA のEcoR I、Sal I 二重切断断片を、大腸菌用発現ベクターであるpET3c に組み込んだ。得られたベクターで大腸菌BL21 (DE3)pLysSを形質転換した後、対数増殖期にある菌体をIPTG (イソプロピルチオ-β-ガラクトシド) で刺激することによって、導入遺伝子の発現を誘導した。この菌体を集め、超音波破碎することによってFGF-1aを遊離させ、遠心上清中にこれを回収した。

8) ペプチドN-グリコシダーゼ F処理によるN-型糖鎖の除去

後述のとおり (試験例 1 参照) ヘパリンセファロースビーズで濃縮したN-FGF-6/1a-II を電気泳動用緩衝液で煮沸、溶出した。その一部に、NP-40(終濃度1%)、トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、ペプチドN-グリコシダーゼ F(0.3 U) を加え、37℃で一晩保温した後、100 °Cで3分間加熱して酵素反応を止めた。これを後述のとおりSDS変性電気泳動によって解析した。

上記、実施例のうち、「1. ヒトリュウドカン cDNA 断片の作成」や「1. マウスFGF-6cDNA断片の作成」で述べたPCRプライマー (#111, #968) を適当な配列に変更し、さらに酵素処理に用いるEcoR Vを平滑末端を生じる適当な制限酵素に変更することによって、様々のS/FGF-1a、N-FGF-6/1a を作成することができる。このようなcDNA配列の例を配列番号8, 20, 22, 24, 26, 28に示す。

また、上記、実施例のうち、「2. O-FGF-6/1aキメラ遺伝子の作成」で述べたPCRに用いる鋳型をS/FGF-1a-II/pBluescript II(KS+) やN-FGF-6/1a-IV/pBluescript II(KS+)

cript II(KS+) などを用いることによって、あるいはPCRプライマー（#098, #116, #115）を適当な配列に変更することによって、あるいはその両方を組み合わせることによって、様々のO-FGF-6/1aを作成することができる。このようなcDNA配列の例を配列番号30に示す。

〔試験例1〕 SDS 変性電気泳動

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地に加えたヘパリンセファロースビーズを洗浄後、直接、電気泳動用緩衝液（SDS, 2-メルカプトエタノール含有）と共に煮沸し、溶出された蛋白質を試料とした。12.5 %アクリルアミドゲルを用い、SDS、2-メルカプトエタノール存在下で電気泳動を行い、ニトロセルロース膜に電氣的に転写後、抗 FGF-1単クローナル抗体、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG抗体を用いて染色し、化学発光法で検出した（図4）。図中、左の矢は分子量既知の標準タンパク質の泳動位置とその分子量（単位：ダルトン）を示す。図中、A)はS/FGF-1a-IIのSDS変性電気泳動図を、B)は、大腸菌で生産したFGF-1a（レーンa）、N-FGF-6/1a-IVをペプチドN-グリコシダーゼFで処理することによりN-型糖鎖を除去したN-FGF-1a-IV（レーンb）、N-FGF-6/1a-IV（レーンc）およびO-FGF-6/1a（レーンd）のSDS変性電気泳動図を示す。

〔試験例2〕 DNA 合成促進活性

HUVEC（ヒト臍帯由来血管内皮細胞）は15%血清存在下でもFGFなどの増殖因子が欠乏すると細胞周期が停止する。このような状態においたHUVECにS/FGF-1a-II, N-FGF-6/1a-IV, O-FGF-6/1aあるいは大腸菌で生産させたFGF-1aを添加し、18時間後、放射標識されたチミジンを6時間取り込ませてこの間にDNA中に取り込まれた放射能によって新たに合成されたDNA量とした。

1. S/FGF-1a-IIのヒト血管内皮細胞へのDNA合成促進効果（ヘパリン非依存性）

S/FGF-1a-II 遺伝子導入細胞の無血清培地での馴化培地をPBSに対して透析後、ヘパリン共存下（5 μ g/ml）、あるいはヘパリン非共存下で、HUVECのDNA合成促進活性を調べた。その結果、S/FGF-1a-IIは、大腸菌で生産したFGF-1aとは

異なり、ヘパリン非依存的に HUVEC の DNA 合成を促進した (図 5)。

2. N-FGF-6/1a-IV のヒト血管内皮細胞への DNA 合成促進効果

N-FGF-6/1a-IV 遺伝子導入細胞の無血清培地での馴化培地を PBS に対して透析後、ヘパリン共存下 ($5 \mu\text{g/ml}$)、あるいはヘパリン非共存下で、HUVEC の DNA 合成促進活性を調べた (図 8)。その結果、N-FGF-6/1a-IV は、大腸菌で生産した FGF-1a と同様に HUVEC の DNA 合成を促進するものの、そのヘパリン依存性は弱く、ヘパリン非共存下では大腸菌由来 FGF-1a よりも強い DNA 合成促進活性を示した (図 8)。

〔試験例 3〕 ヘパリン親和性アフィニティークロマトグラフィー

前述 2) で得られた S/FGF-1a-II について、ヘパリン親和性を調べた。S/FGF-1a-II の分泌細胞の馴化培地にヘパリンセファロースビーズを加え、 4°C で 2 時間以上攪拌した。低速遠心によって沈降するビーズを回収し、生理的リン酸緩衝液 (PBS : phosphate buffered saline, pH 7.4) で十分に洗浄後、 2.5 M NaCl を含む PBS によってヘパリン固定化ビーズに結合した蛋白質を溶出した。さらにこの溶出液に蒸留水を加え塩濃度を低下させた後、再び、ヘパリン親和性アフィニティークロマトグラフィーに供し、 NaCl の濃度勾配によって S/FGF-1a-II を溶出した。

大腸菌由来 FGF-1a は約 1.0 M NaCl 付近に溶出されるのに対し、S/FGF-1a-II は約 0.4 M NaCl で溶出され、固定化ヘパリンへの親和性が低下しているものと考えられた (図 9)。図 9 で見られる 1.0 M NaCl 付近の小さなピークについては、SDS 変性電気泳動の結果、S/FGF-1a-II の分解産物と考えられる。

〔試験例 4〕 FGF-1a 類似蛋白質の耐熱安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地を PBS に対して十分に透析し、その一部を 56°C または 70°C に保温した PBS 中に 30 分間保持、あるいは、室温で 12 時間保持した後、再び 4°C の PBS に対して透析し、試料とした。S/FGF-1a-II の安定性は、各種処理の後、HUVEC の DNA 合成促進活性試験に供し、 4°C の

PBS で12時間透析した試料との比較によって、安定性の指標とした。

室温、12時間では、大腸菌由来 FGF-1a でもヘパリンによってその活性は保護されるが、S/FGF-1a-II はヘパリンの有無に関わらず活性は保持された。

また、56℃、30分の熱処理では大腸菌由来 FGF-1a はほとんど失活するにも関わらず、S/FGF-1a-II は約 50 % の活性が残存し、耐熱安定性が向上しているものと考えられた（図 6）。

〔試験例 5〕 FGF-1a 類似蛋白質の耐酸、耐アルカリ安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地を PBS に対して十分に透析し、その一部を pH 4.0 のクエン酸緩衝液または pH 10.0 の炭酸ナトリウム緩衝液中で12時間透析し、再び 4℃の PBS に対して透析した後、試料とした。S/FGF-1a-I の安定性は、各種処理の後、HUVEC のDNA 合成促進活性試験に供し、4℃のPBS で12時間透析した試料との比較によって、安定性の指標とした。

S/FGF-1a-II はヘパリンの存在の有無に関わらず pH 4.0 の酸処理によってもほとんど活性の低下がみられず、耐酸安定性の向上が認められた（図 6）。また、pH 10.0 のアルカリ処理によって、大腸菌由来 FGF-1a がほとんど活性を消失するにも関わらず、S/FGF-1a-II は約50%の活性を保持しており、耐アルカリ安定性についても向上が認められた（図 6）。

〔試験例 6〕 FGF-1a 類似蛋白質の抗蛋白質分解酵素安定性

各種 FGF-1a 類似蛋白質の分泌細胞の馴化培地をPBSに対して十分に透析し、その一部に各種濃度のトリプシン液（0.0001～0.1%）を加え、37℃で1時間保温した。これを前述のSDS変性電気泳動に供し、残存するバンドの強度を処理前の試料と比較することで安定性の指標とした。

その結果、図 7 に示すとおり、S/FGF-1a-II は0.001%のトリプシン処理で88%、0.01%で35%の染色強度が残存するのに対し、大腸菌由来FGF-1aは0.001%で58%、0.01%で6%にまでバンドの強度が減少しており、S/FGF-1a-II は蛋白質分解酵素に対する抵抗性が増大しているものと考えられた（図 7）。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：221

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
1 5 10 15
Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
20 25 30
Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
35 40 45
Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
50 55 60
Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
65 70 75 80
Pro Leu Val Pro Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr
85 90 95
Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val
100 105 110
Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser
115 120 125
Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln
130 135 140
Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro
145 150 155 160
Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn

165	170	175
Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu		
180	185	190
Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln		
195	200	205
Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp		
210	215	220

配列番号 : 2

配列の長さ : 6 6 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

```

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAAGTGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGAAGTGAA GACTCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT 240
CCCTTGGTGC CTCTAGATGC TAATTACAAG AAGCCCAAAC TCCTCTACTG TAGCAACGGG 300
GGCCACTTCC TGAGGATCCT TCCGGATGGC ACAGTGGATG GGACAAGGGA CAGGAGCGAC 360
CAGCACATTC AGCTGCAGCT CAGTGCGGAA AGCGTGGGGG AGGTGTATAT AAAGAGTACC 420
GAGACTGGCC AGTACTTGGC CATGGACACC GACGGGCTTT TATACGGCTC ACAGACACCA 480
AATGAGGAAT GTTTGTTCCT GGAAAGGCTG GAGGAGAACC ATTACAACAC CTATATATCC 540
AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTT GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 600
GGTCCTCGGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTTC TCCCCCTGCC AGTCTCTTCT 660
GAT

```

配列番号 : 3

配列の長さ：175

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val

5

10

15

Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala

20

25

30

Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu

35

40

45

Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly

50

55

60

Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln

65

70

75

80

Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr

85

90

95

Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln

100

105

110

Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His

115

120

125

Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val

130

135

140

Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr

145

150

155

160

Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp

165

170

175

配列番号：4

配列の長さ：5 2 5

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GCGCGCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC 120
GCTAATTACA AGAAGCCCCAA ACTCCTCTAC TGTAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180
CTTCCGGATG GCACAGTGGG TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240
CTCAGTGC GG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTC 360
CTGGAAAGGC TGGAGGAGAA CCATTACAAC ACCTATATAT CCAAGAAGCA TGCAGAGAAG 420
AATTGGTTTG TTGGCCTCAA GAAGAATGGG AGCTGCAAAC GCGGTCCTCG GACTCACTAT 480
GGCCAGAAAG CAATCTTGTT TCTCCCCCTG CCAGTCTCTT CTGAT 525

配列番号：5

配列の長さ：1 8 1

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
5 10 15
Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
20 25 30
Arg Ala Gln Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly

50	55	60
Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln		
65	70	75
Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr		80
	85	90
Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln		95
	100	105
Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Ala Ala		110
	115	120
Thr Pro Ala Pro Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala		125
	130	135
Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg		140
145	150	155
Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu		160
	165	170
Pro Val Ser Ser Asp		175
	180	

配列番号 : 6

配列の長さ : 5 4 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
 CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGC GCCCGCG CCCAAGGCAC GCTACTGGAC 120
 GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180
 CTTCCGGATG GCACAGTGGA TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240

CTCAGTGC GG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
 GCCATGGACA CCCACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTC 360
 CTGGAAAGGC TGGAGGAGGC TGCTACTCCA GCTCCAAACC ATTACAACAC CTATATATCC 420
 AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTG GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 480
 GGTCCCTCGGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTTC TCCCCCTGCC AGTCTCTTCT 540
 GAT 543

配列番号： 7

配列の長さ： 3 0

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

TTGTGACCC ACCATGGCCC CCGCCCGTCT 30

配列番号： 8

配列の長さ： 2 6

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

1 列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列

TTGATATCTA GAGGCACCAA GGGATG 26

配列番号： 9

配列の長さ： 3 5

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACAG CGCTAATTAC AAGAAGCCCA AACTC

35

配列番号：1 0

配列の長さ：3 3

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGAATTCGA ATTCTTTAAT CAGAAGAGAC TGG

33

配列番号：1 1

配列の長さ：6 4

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACCC ACCATGTCCC GGGGAGCAGG ACGTGTTTAC GGCACGCTGC AGGCTCTCGT 60

CTTC 64

配列番号：1 2

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGATATCCA GTAGCGTGCC GTTGGCGCG

29

配列番号：1 3

配列の長さ：1 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGTCGACCC ACCATGTC

18

配列番号：1 4

配列の長さ：2 9

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGATATCCA GTAGCGTGCC TTGGGCGCG

29

配列番号：1 5

配列の長さ：3 8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCTGGAGGAG GCTGCTACTC CAGCTCCAAA CCATTACA

38

配列番号：1 6

配列の長さ：2 1

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCGCTCTAG AACTAGTGGA T

21

配列番号：1 7

配列の長さ：2 0 0

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly

1

5

10

15

Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu

20

25

30

Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val

35

40

45

Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly

50	55	60
Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly		
65	70	75
His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp		80
	85	90
Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly		95
	100	105
Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp		110
	115	120
Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu		125
	130	135
Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys		140
145	150	155
Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser		160
	165	170
Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe		175
	180	185
Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp		190
	195	200

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 6 0 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
 ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120

GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
 TCTGGCTCTG GAGATGCTAA TTACAAGAAG CCCAAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC 240
 CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG 300
 CACATTCAGC TGCAGCTCAG TGCGGAAAGC GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG 360
 ACTGGCCAGT ACTTGGCCAT GGACACCGAC GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT 420
 GAGGAATGTT TGTTCCTGGA AAGGCTGGAG GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG 480
 AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT 540
 CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 600

配列番号： 1 9

配列の長さ： 2 0 0

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列

Met	Ala	Pro	Ala	Arg	Leu	Phe	Ala	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Gly	
					5				10				15			
Val	Ala	Glu	Ser	Ile	Arg	Glu	Thr	Glu	Val	Ile	Asp	Pro	Gln	Asp	Leu	
				20				25					30			
Leu	Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Ser	Gly	Ala	Leu	Ser	Asp	Asp	Glu	Asp	Val	
				35				40					45			
Val	Gly	Pro	Gly	Gln	Glu	Ser	Asp	Asp	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly	Ser	Gly	
				50				55					60			
Asp	Ala	Asn	Tyr	Lys	Lys	Pro	Lys	Leu	Leu	Tyr	Cys	Ser	Asn	Gly	Gly	
				65				70					75		80	
His	Phe	Leu	Arg	Ile	Leu	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Asp	Gly	Thr	Arg	Asp	
				85				90					95			
Arg	Ser	Asp	Gln	His	Ile	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Ala	Glu	Ser	Val	Gly	
				100				105					110			

Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp

115

120

125

Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu

130

135

140

Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys

145

150

155

160

Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser

165

170

175

Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe

180

185

190

Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp

195

200

配列番号 : 2 0

配列の長さ : 6 0 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
GCCCTATCAG ACGATGAGGA TGTAGTGGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
TCTGGCTCTG GAGATGCTAA TTACAAGAAG CCCAAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC 240
CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG 300
CACATTCAGC TGCAGCTCAG TGCGGAAAGC GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG 360
ACTGGCCAGT ACTTGGCCAT GGACACCGAC GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT 420
GAGGAATGTT TGTTCTGGA AAGGCTGGAG GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG 480
AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT 540

CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 600

配列番号 : 2 1

配列の長さ : 2 5 4

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ala Pro Ala Arg Leu Phe Ala Leu Leu Leu Phe Phe Val Gly Gly
5 10 15
Val Ala Glu Ser Ile Arg Glu Thr Glu Val Ile Asp Pro Gln Asp Leu
20 25 30
Leu Glu Gly Arg Tyr Phe Ser Gly Ala Leu Pro Asp Asp Glu Asp Val
35 40 45
Val Gly Pro Gly Gln Glu Ser Asp Asp Phe Glu Leu Ser Gly Ser Gly
50 55 60
Asp Leu Asp Asp Leu Glu Asp Ser Met Ile Gly Pro Glu Val Val His
65 70 75 80
Pro Leu Val Pro Leu Asp Asn His Ile Pro Glu Arg Ala Gly Ser Gly
85 90 95
Ser Gln Val Pro Thr Glu Pro Lys Lys Leu Glu Glu Asn Glu Val Ile
100 105 110
Pro Lys Arg Ile Ser Pro Val Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu
115 120 125
Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr
130 135 140
Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu
145 150 155 160
Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly

165 170 175
 Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr
 180 185 190
 Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr
 195 200 205
 Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly
 210 215 220
 Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly
 225 230 235 240
 Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp
 245 250

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 7 6 2

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGGCCCCCG CCCGTCTGTT CGCGCTGCTG CTGTTCTTCG TAGGCGGAGT CGCCGAGTCG 60
 ATCCGAGAGA CTGAGGTCAT CGACCCCCAG GACCTCCTAG AAGGCCGATA CTTCTCCGGA 120
 GCCCTACCAG ACGATGAGGA TGTAAGTGGG CCCGGGCAGG AATCTGATGA CTTTGAGCTG 180
 TCTGGCTCTG GAGATCTGGA TGAAGTGGAA GACTCCATGA TCGGCCCTGA AGTTGTCCAT 240
 CCCTTGGTGC CTCTAGATAA CCATATCCCT GAGAGGGCAG GGTCTGGGAG CCAAGTCCCC 300
 ACCGAACCCA AGAACTAGA GGAGAATGAG GTTATCCCCA AGAGAATCTC ACCCGTTGCT 360
 AATTACAAGA AGCCCAAACCT CCTCTACTGT AGCAACGGGG GCCACTTCCT GAGGATCCTT 420
 CCGGATGGCA CAGTGGATGG GACAAGGGAC AGGAGCGACC AGCACATTCA GCTGCAGCTC 480
 AGTGCGGAAA GCGTGGGGGA GGTGTATATA AAGAGTACCG AACTGGCCA GACTTGGCC 540
 ATGGACACCG ACGGGCTTTT ATACGGCTCA CAGACACCAA ATGAGGAATG TTTGTTCTG 600

Year	1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100
1970	1971	1972	1973	1974	1975	1976	1977	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	2026	2027	2028	2029	2030	2031	2032	2033	2034	2035	2036	2037	2038	2039	2040	2041	2042	2043	2044	2045	2046	2047	2048	2049	2050	2051	2052	2053	2054	2055	2056	2057	2058	2059	2060	2061	2062	2063	2064	2065	2066	2067	2068	2069	2070	2071	2072	2073	2074	2075	2076	2077	2078	2079	2080	2081	2082	2083	2084	2085	2086	2087	2088	2089	2090	2091	2092	2093	2094	2095	2096	2097	2098	2099	2100	

-

2

Glu Val Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly

145	150	155	160
Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg			
	165	170	175
Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val			
	180	185	190
Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met			
	195	200	205
Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys			
	210	215	220
Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser			
	225	230	235
Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly			
	245	250	255
Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu			
	260	265	270
Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp			
	275	280	

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 8 4 3

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGGCCCCCG	CCCGTCTGTT	CGCGCTGCTG	CTGTTCTTCG	TAGGCGGAGT	CGCCGAGTCG	60
ATCCGAGAGA	CTGAGGTCAT	CGACCCCCAG	GACCTCCTAG	AAGGCCGATA	CTTCTCCGGA	120
GCCCTACCAG	ACGATGAGGA	TGTAGTGGGG	CCCGGGCAGG	AATCTGATGA	CTTTGAGCTG	180
TCTGGCTCTG	GAGATCTGGA	TGACTTGAA	GA	CTCCATGA	TCGGCCCTGA	240
				AGTTGTCCAT		

CCCTTGGTGC CTCTAGATAA CCATATCCCT GAGAGGGCAG GGTCTGGGAG CCAAGTCCCC 300
 ACCGAACCCA AGAAACTAGA GGAGAATGAG GTTATCCCCA AGAGAATCTC ACCCGTTGAA 360
 GAGAGTGAGG ATGTGTCCAA CAAGGTGTCA ATGTCCAGCA CTGTGCAGGG CAGCAACATC 420
 TTTGAGAGAA CGGAGGTGCG TAATTACAAG AAGCCCAAAC TCCTCTACTG TAGCAACGGG 480
 GGCCACTTCC TGAGGATCCT TCCGGATGGC ACAGTGGATG GGACAAGGGA CAGGAGCGAC 540
 CAGCACATTC AGCTGCAGCT CAGTGC GGAA AGCGTGGGGG AGGTGTATAT AAAGAGTACC 600
 GAGACTGGCC AGTACTTGGC CATGGACACC GACGGGCTTT TATACGGCTC ACAGACACCA 660
 AATGAGGAAT GTTTGTTTCT GGAAAGGCTG GAGGAGAACC ATTACAACAC CTATATATCC 720
 AAGAAGCATG CAGAGAAGAA TTGGTTTGTG GGCCTCAAGA AGAATGGGAG CTGCAAACGC 780
 GGTCTCTCGA CTCACTATGG CCAGAAAGCA ATCTTGTTTC TCCCCCTGCC AGTCTCTTCT 840
 GAT 843

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 1 7 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val

5

10

15

Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala

20

25

30

Arg Ala Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu Leu Tyr Cys

35

40

45

Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly Thr Val Asp

50

55

60

Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln Leu Ser Ala

65

70

75

80

Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr Gly Gln Tyr

	85	90	95
Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln Thr Pro Asn			
100	105	110	
Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn His Tyr Asn Thr			
115	120	125	
Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys			
130	135	140	
Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys			
145	150	155	160
Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser Ser Asp			
165	170		

配列番号 : 2 6

配列の長さ : 5 1 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC	60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GGCGCCCGCG CCAACGGCTC GGCTAATTAC	120
AAGAAGCCCA AACTCCTCTA CTGTAGCAAC GGGGGCCACT TCCTGAGGAT CCTTCCGGAT	180
GGCACAGTGG ATGGGACAAG GGACAGGAGC GACCAGCACA TTCAGCTGCA GCTCAGTGCG	240
GAAAGCGTGG GGGAGGTGTA TATAAAGAGT ACCGAGACTG GCCAGTACTT GGCCATGGAC	300
ACCGACGGGC TTTTATACGG CTCACAGACA CCAAATGAGG AATGTTTGTT CCTGGAAAGG	360
CTGGAGGAGA ACCATTACAA CACCTATATA TCCAAGAAGC ATGCAGAGAA GAATTGGTTT	420
GTTGGCCTCA AGAAGAATGG GAGCTGCAAA CGCGGTCCTC GGACTCACTA TGGCCAGAAA	480
GCAATCTTGT TTCTCCCCCT GCCAGTCTCT TCTGAT	516

配列番号： 2 7

配列の長さ： 2 1 0

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val

5 10 15

Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala

20 25 30

Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ser Arg Gly Trp Gly Thr Leu Leu

35 40 45

Ser Arg Ser Arg Ala Gly Leu Ala Gly Glu Ile Ser Gly Val Asn Trp

50 55 60

Glu Ser Gly Tyr Leu Val Gly Ile Lys Arg Gln Ala Asn Tyr Lys Lys

65 70 75 80

Pro Lys Leu Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu

85 90 95

Pro Asp Gly Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile

100 105 110

Gln Leu Gln Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser

115 120 125

Thr Glu Thr Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr

130 135 140

Gly Ser Gln Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu

145 150 155 160

Glu Asn His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu Lys Asn

165 170 175

Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly Pro Arg

180 185 190
 Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro Val Ser
 195 200 205

Ser Asp

210

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 6 3 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAGGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
 CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GCGGCCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC 120
 TCCAGAGGCT GGGGCACCCT CTTGTCCAGG TCTCGAGCTG GGCTAGCTGG AGAGATTTTCG 180
 GGTGTGAATT GGGAAAGCGG CTATTTGGTG GGCATTAAGC GACAGGCTAA TTACAAGAAG 240
 CCCAAACTCC TCTACTGTAG CAACGGGGGC CACTTCCTGA GGATCCTTCC GGATGGCACA 300
 GTGGATGGGA CAAGGGACAG GAGCGACCAG CACATTCAGC TGCAGCTCAG TGCGGAAAGC 360
 GTGGGGGAGG TGTATATAAA GAGTACCGAG ACTGGCCAGT ACTTGGCCAT GGACACCGAC 420
 GGGCTTTTAT ACGGCTCACA GACACCAAAT GAGGAATGTT TGTTCTGGA AAGGCTGGAG 480
 GAGAACCATT ACAACACCTA TATATCCAAG AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC 540
 CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC 600
 TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 630

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 1 8 0

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ser Arg Gly Ala Gly Arg Val Gln Gly Thr Leu Gln Ala Leu Val
5 10 15
Phe Leu Gly Val Leu Val Gly Met Val Val Pro Ser Pro Ala Gly Ala
20 25 30
Arg Ala Asn Gly Thr Leu Leu Asp Ala Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Tyr Cys Ser Asn Gly Gly His Phe Leu Arg Ile Leu Pro Asp Gly
50 55 60
Thr Val Asp Gly Thr Arg Asp Arg Ser Asp Gln His Ile Gln Leu Gln
65 70 75 80
Leu Ser Ala Glu Ser Val Gly Glu Val Tyr Ile Lys Ser Thr Glu Thr
85 90 95
Gly Gln Tyr Leu Ala Met Asp Thr Asp Gly Leu Leu Tyr Gly Ser Gln
100 105 110
Thr Pro Asn Glu Glu Cys Leu Phe Leu Glu Arg Leu Glu Glu Asn Ala
115 120 125
Thr Pro Ala Pro His Tyr Asn Thr Tyr Ile Ser Lys Lys His Ala Glu
130 135 140
Lys Asn Trp Phe Val Gly Leu Lys Lys Asn Gly Ser Cys Lys Arg Gly
145 150 155 160
Pro Arg Thr His Tyr Gly Gln Lys Ala Ile Leu Phe Leu Pro Leu Pro
165 170 175
Val Ser Ser Asp
180

配列番号：30

配列の長さ：540

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATGTCCCGGG GAGCAGGACG TGTTCAAGGC ACGCTGCAGG CTCTCGTCTT CTTAGGCGTC 60
CTAGTGGGCA TGGTGGTGCC CTCACCTGCC GCGCGCCGCG CCAACGGCAC GCTACTGGAC 120
GCTAATTACA AGAAGCCCAA ACTCCTCTAC TGTAAGCAACG GGGGCCACTT CCTGAGGATC 180
CTTCCGGATG GCACAGTGGA TGGGACAAGG GACAGGAGCG ACCAGCACAT TCAGCTGCAG 240
CTCAGTGCGG AAAGCGTGGG GGAGGTGTAT ATAAAGAGTA CCGAGACTGG CCAGTACTTG 300
GCCATGGACA CCGACGGGCT TTTATACGGC TCACAGACAC CAAATGAGGA ATGTTTGTTC 360
CTGGAAAGGC TGGAGGAGAA CGCTACTCCA GCTCCACATT ACAACACCTA TATATCCAAG 420
AAGCATGCAG AGAAGAATTG GTTTGTTGGC CTCAAGAAGA ATGGGAGCTG CAAACGCGGT 480
CCTCGGACTC ACTATGGCCA GAAAGCAATC TTGTTTCTCC CCCTGCCAGT CTCTTCTGAT 540

請求の範囲

1. 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質。
2. 糖鎖が、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項1記載のヘパリン結合性タンパク質。
3. ヘパリン結合性タンパク質がFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子である請求項1または2に記載のヘパリン結合性タンパク質。
4. 糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合している請求項1記載のヘパリン結合性タンパク質。
5. 糖鎖を共有結合させるヘパリン結合性タンパク質が、以下の(a)または(b)のいずれかのタンパク質である請求項4記載のヘパリン結合性タンパク質。
(a) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質
(b) 配列番号1、3、5、17、19、21、23、25、27または29のいずれかのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、付加若しくは修飾されたアミノ酸配列からなり、FGF活性を有し、かつ糖鎖の付加を受けることができるタンパク質
6. ヘパリン結合性タンパク質の2次構造においてターンを形成している部位又は末端近傍に糖鎖が結合しているか、あるいは、糖鎖付加によって3次元構造が大きく変化しない部位に糖鎖が結合している請求項1記載のヘパリン結合性タンパク質。
7. 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、以下の工程：
(a) 糖鎖の付加を受けることができるペプチドをコードするcDNAとヘパリン結合性タンパク質をコードするcDNAとを連結する工程、
(b) 当該連結cDNAを発現ベクターに組み込む工程、
(c) 当該発現ベクターを糖鎖付加経路を有する宿主細胞に導入する工程、および

(d) 当該宿主細胞において、糖鎖の付加を受けることができるペプチドを介して糖鎖が共有結合しているヘパリン結合性タンパク質を発現させる工程を含む前記の方法。

8. 糖鎖が硫酸化多糖またはグリコサミノグリカンであり、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがプロテオグリカンコアタンパク質またはその一部分である請求項7記載の方法。

9. 糖鎖がN-型糖鎖であり、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがN-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドである請求項7記載の方法。

10. 糖鎖がO-型糖鎖であり、糖鎖の付加を受けることができるペプチドがO-型糖鎖付加アミノ酸配列を含むペプチドである請求項7記載の方法。

11. 糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質の製造方法であって、糖鎖を化学的結合法によりヘパリン結合性タンパク質に結合させる工程を含む前記の方法。

12. 糖鎖が、硫酸化多糖、グリコサミノグリカン、N-型糖鎖、O-型糖鎖、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される請求項11記載の方法。

13. ヘパリン結合性タンパク質がFGFファミリーに属する因子またはその近縁の因子である請求項7～12いずれかに記載の製造方法。

14. 請求項1～6のいずれかに記載のヘパリン結合性タンパク質を有効成分として含有する医薬組成物。

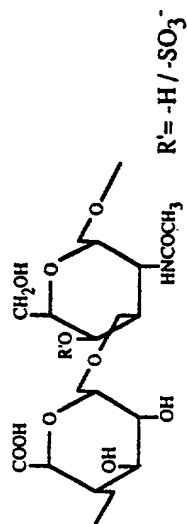
15. 糖鎖を持たない天然のタンパク質に糖鎖を共有結合させることにより、タンパク質を高機能化する方法。

開示の要約

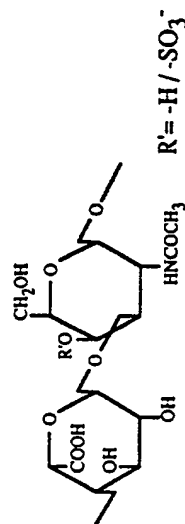
糖鎖を共有結合させることにより高機能化されたヘパリン結合性タンパク質、その製造方法およびそれを有効成分として含有する医薬組成物、並びに糖鎖を持たない天然のタンパク質に糖鎖を共有結合させることにより、タンパク質を高機能化する方法。

【図 1】

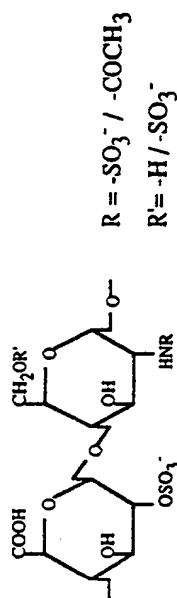
1) コンドロイチン硫酸 / (GlcA-GalN)n



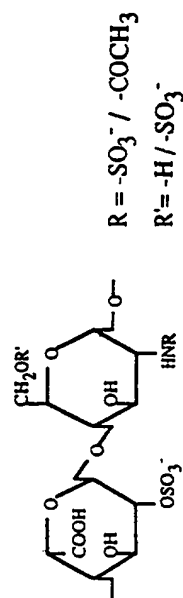
2) デルマトラン硫酸 / (IdoA/GlcA-GalN)n



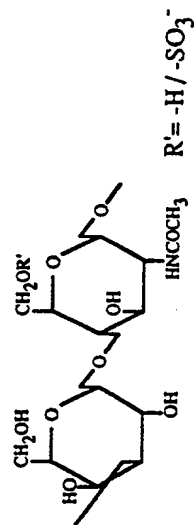
3) ヘパラン硫酸 / (GlcA/IdoA-GlcN)n



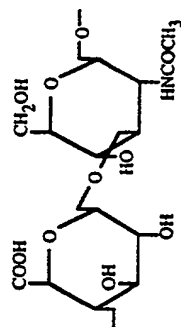
4) ヘパリン / (IdoA/GlcA-GlcN)n



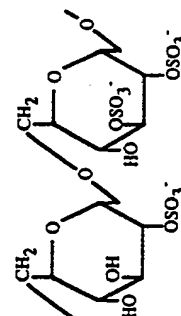
5) ケラタン硫酸 / (Gal-GlcN)n



6) ヒアルロン酸 / (GlcA-GlcN)n

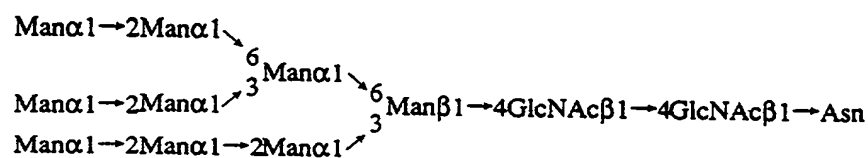


7) デキストラン硫酸 / (Glc-Glc)n

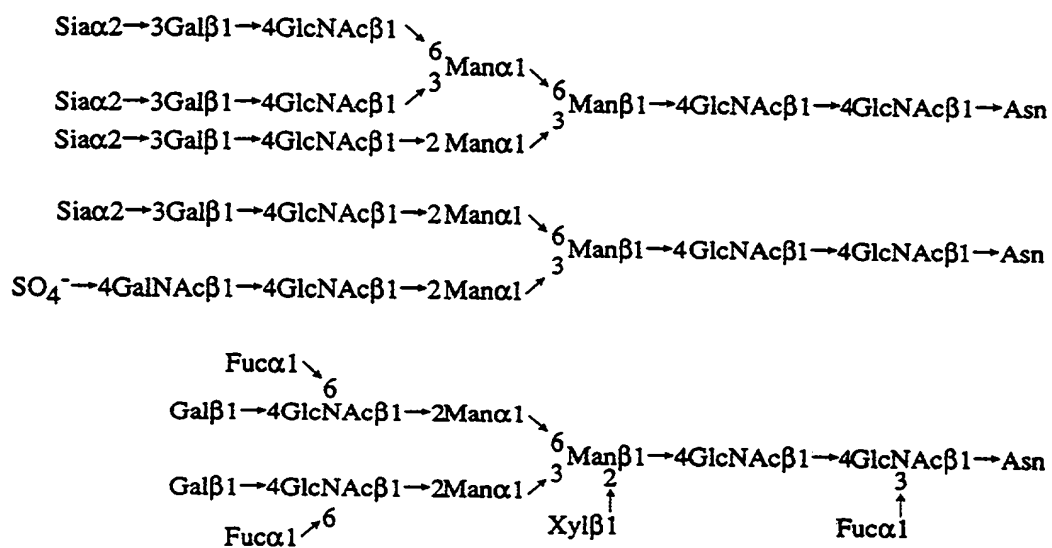


【图 2】

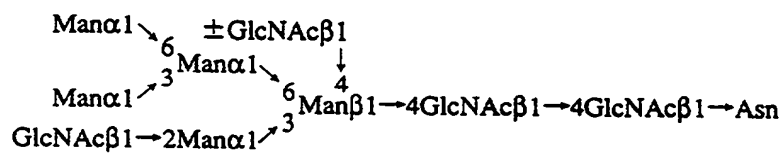
1) 高マンノース型



2) 複合型



3) 混成型



GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

NeuAc α 2 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

1) I 型 コア

Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

NeuAc α 2 \rightarrow 6Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

NeuGc α 2 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
Fuc α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

(\rightarrow 8NeuGc α 2) n \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
GalNAc β 1 \rightarrow 4GalNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
NeuGc α 2 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
2) II 型 コア

NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

3) III 型 コア

NeuAc α 2 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
Fuc α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

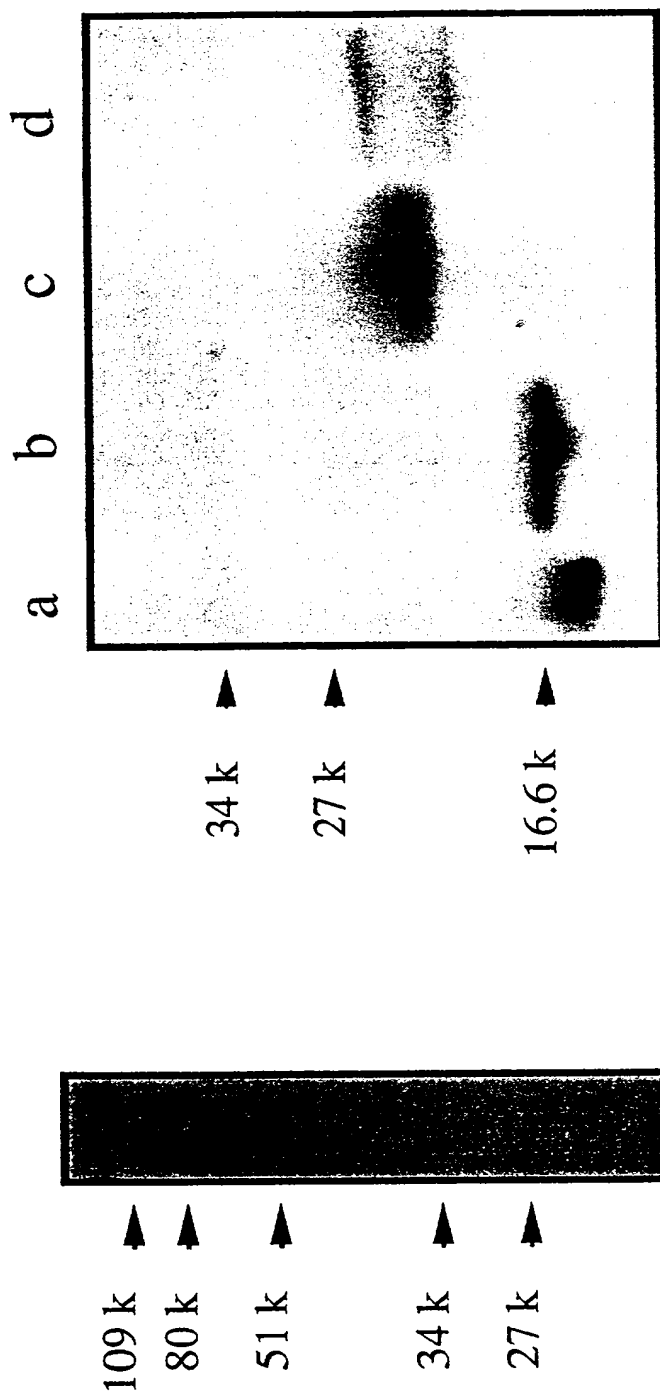
4) IV 型 コア

GlcNAc β 1 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
Fuc α 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

5) V 型 コア

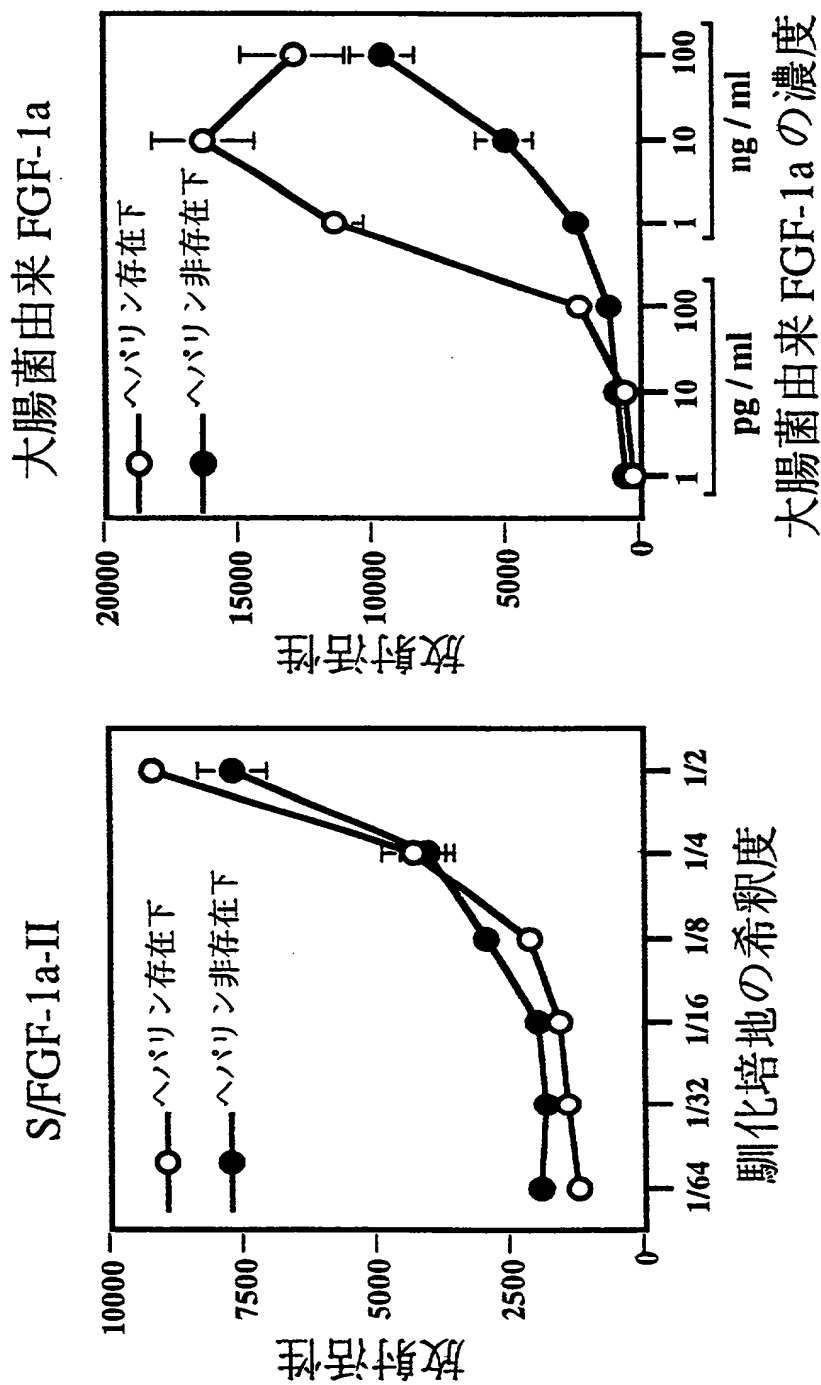
Gal α 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr
NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 6GalNAc α 1 \rightarrow Ser/Thr

【図 4】
A) S/FGF-1a-II 蛋白質の SDS 変性電気泳動図
B) N-FGF-1a-IV、および O-FGF-1a 蛋白質の SDS 変性電気泳動図

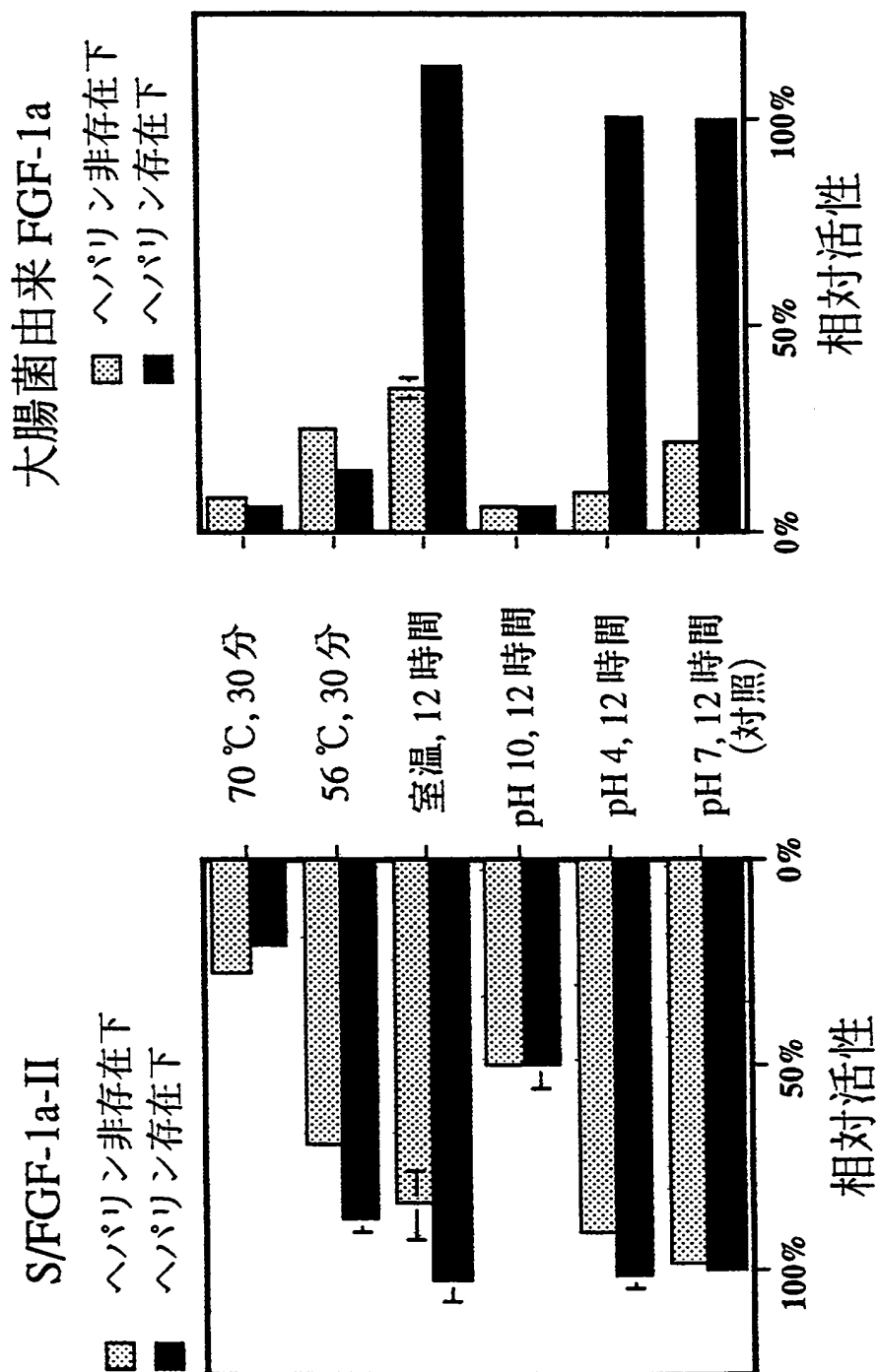


レーン a: 大腸菌で生産した FGF-1a
レーン b: ペプチド N-グリコシダーゼ F で処理することにより
N-型糖鎖を除去した N-FGF-6/1a-II
レーン c: N-FGF-6/1a-II
レーン d: O-FGF-6/1a

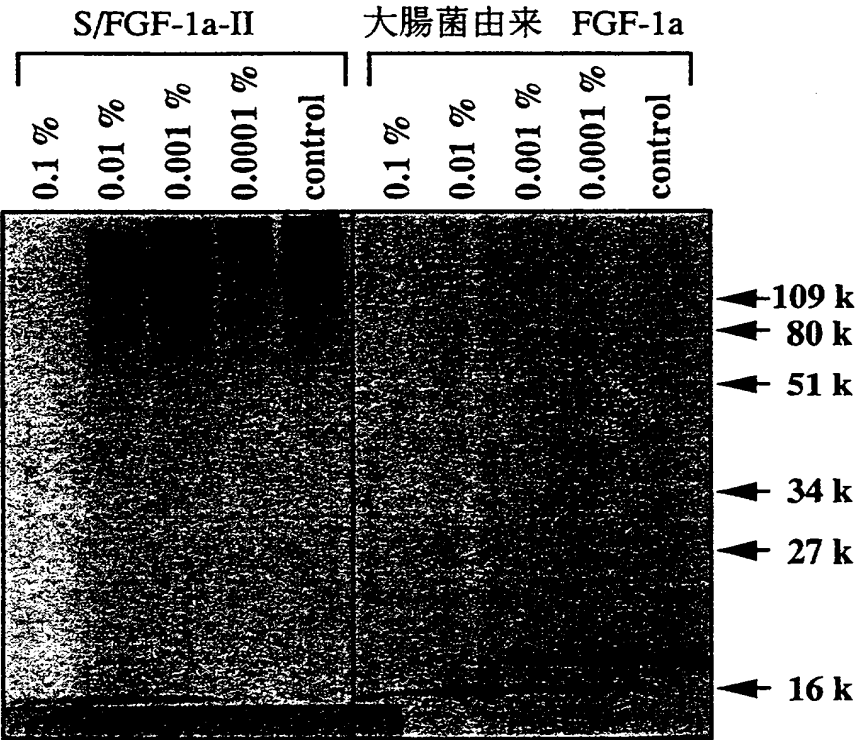
【図 5】



【図 6】

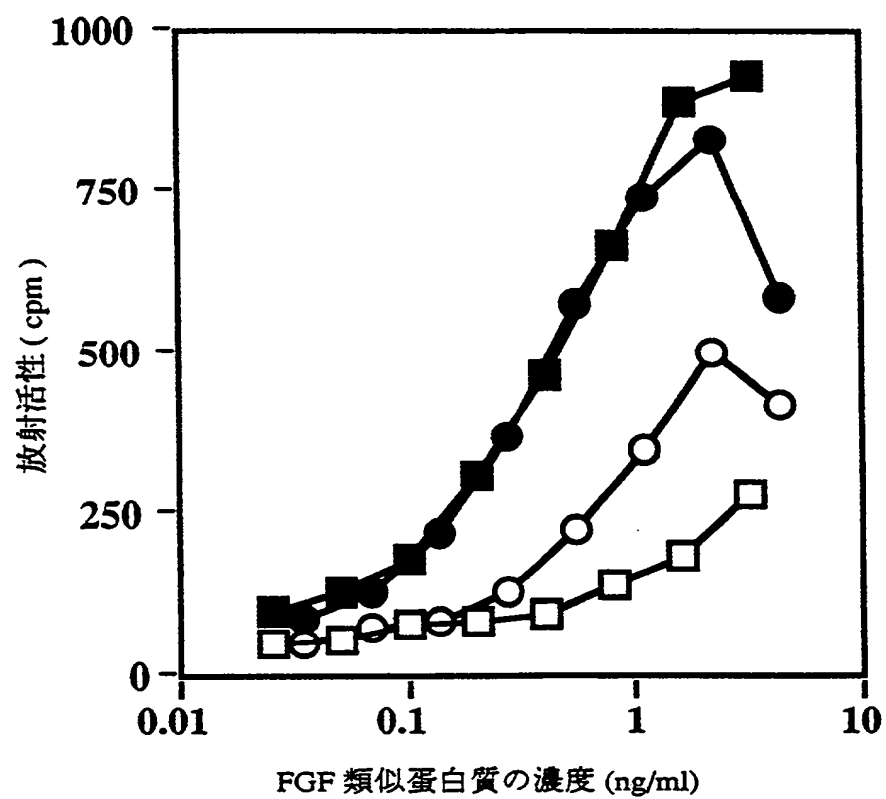


【図 7】



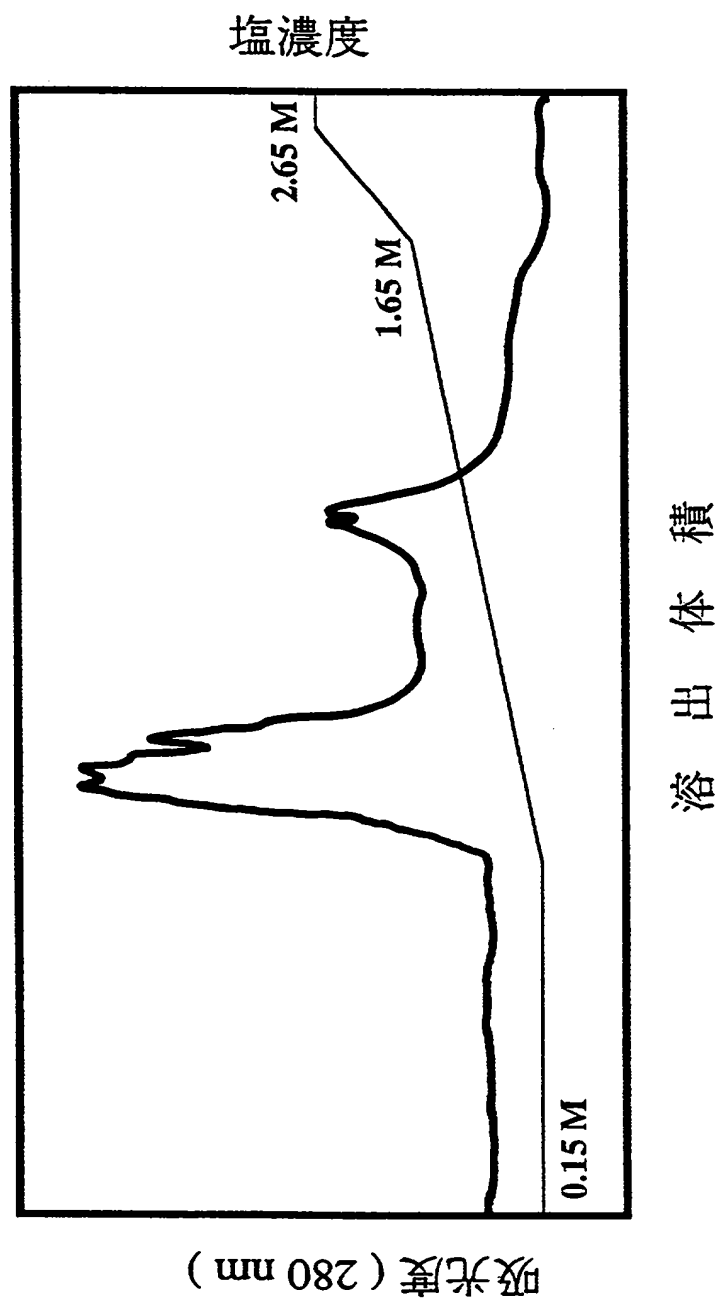
bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.14.038460>; this version posted April 14, 2020. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

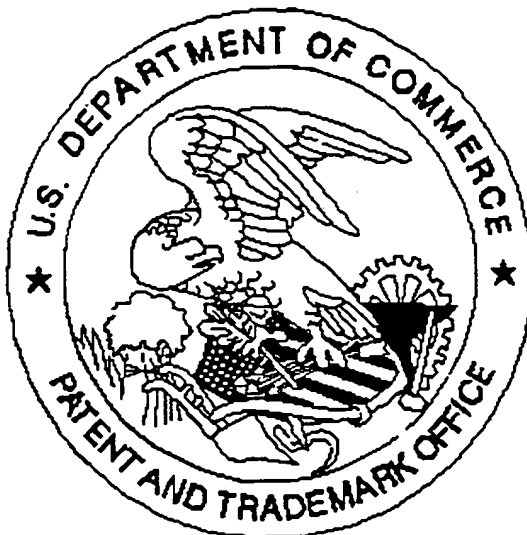
【図 8】



- 大腸菌由来 FGF-1a / ヘパリン存在下
- 大腸菌由来 FGF-1a / ヘパリン非存在下
- N-FGF-6/1a-IV / ヘパリン存在下
- N-FGF-6/1a-IV / ヘパリン非存在下

【図 9】





1. Application papers are not suitable for scanning and are not in compliance with 37 CFR 1.52 because:

- 1.52 because.
- ☐ All sheets must be the same size and either A4 (21 cm x 29.7 cm) or 8-1/2" x 11". Pages _____ do not meet these requirements.
 - ☐ Papers are not flexible, strong, smooth, non-shiny, durable, and white.
 - ☐ Papers are not typewritten or mechanically printed in permanent ink on one side.
 - ☐ Papers contain improper margins. Each sheet must have a left margin of at least 2.5 cm (1") and top, bottom and right margins of at least 2.0 cm (3/4").
 - ☐ Papers contain hand lettering.

2. Drawings are not in compliance and were not scanned because:

- ☐ The drawings or copy of drawings are not suitable for electronic reproduction.
- ☐ All drawings sheets are not the same size. Pages must be either A4 (21 cm x 29.7 cm) or 8-1/2" x 11".
- ☐ Each sheet must include a top and left margin of at least 2.5 cm (1"), a right margin of at least 1.5 cm (9/16") and a bottom margin of at least 1.0 cm (3/8").

3. Page(s) _____ are not of sufficient clarity, contrast and quality for electronic reproduction.

4. Page(s) _____ are missing.

5. OTHER: No Declarations Enclosed